

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C09B 11/02, 11/26, G01N 33/533, 33/58, C07H 21/00 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/64987 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. November 2000 (02.11.00) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/03569 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. April 2000 (19.04.00) (30) Prioritätsdaten: 199 19 120.4 27. April 1999 (27.04.99) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: DREXHAGE, Karl-Heinz [DE/DE]; Schanzenweg 50, D-57076 Siegen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ARDEN-JACOB, Jutta [DE/DE]; Am Hügel 25, D-90513 Zimndorf (DE). KEM-NITZER, Norbert [DE/DE]; Kronprinzenstrasse 106, D-57250 Netphen (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE). | (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> | |
| (54) Title: NOVEL AMIDOPYRYLIUM FLUORESCENCE DYES (54) Bezeichnung: NEUE AMIDOPYRYLIUM-FLUORESZENZ-FARBSTOFFE (57) Abstract <p>The invention relates to the use of amidopyrylium compounds as marker groups in methods for detecting analytes. It further relates to novel amidopyrylium compounds.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von Amidopyrylium-Verbindungen als Markierungsgruppen in Verfahren zum Nachweis von Analyten sowie neue Amidopyrylium-Verbindungen.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Letland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Neue Amidopyrylium-Fluoreszenz-Farbstoffe

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft die Verwendung von Amidopyrylium-Verbindungen als Markierungsgruppen in Verfahren zum Nachweis von Analyten sowie neue Amidopyrylium-Verbindungen.

Xanthene zählen zu den lange bekannten und gut erforschten
10 Fluoreszenzfarbstoffen. Ein verwandter Farbstoff mit abgewandeltem Grundgerüst, das 3,10-Bis-(dimethylamino)-5-methyl-6-oxo-6H[1]-benzopyrano[3,2-c]chinoliniumkation, wurde von H. Harnisch, Liebigs Ann. Chem. 751, 155-158 (1971), beschrieben.

- 15 Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Pyranen wurden derartige Verbindungen von K.H. Drexhage, Structure and Properties of Laser Dyes, in: F.P. Schäfer, Topics in Applied Physics, Vol. I, Dye Lasers, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, auch als Amidopyrylium-Verbindungen bezeichnet. In dieser Veröffentlichung werden weitere als Farbstoff 140 und
20 141 bezeichnete Amidopyrylium-Verbindungen beschrieben. Ein Hinweis auf die Verwendung von Amidopyrylium-Verbindungen als Fluoreszenz-Markierungsgruppen in der Analytik findet sich nicht in der Literatur.

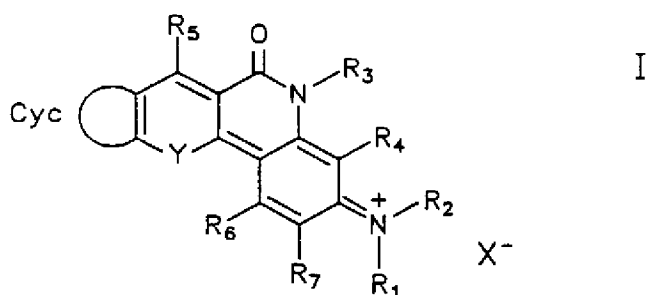
- Bisher in der chemischen, medizinischen und biologischen Analytik
25 verwendete Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren meist im Bereich < 600 nm. Daraus ergeben sich bei einer Verwendung als Markierungsgruppe, insbesondere bei biologischen Systemen, gravierende Nachteile: Für diagnostische Systeme ist es zweckmäßig, preisgünstige Lichtquellen wie z.B. Laserdioden (635 bzw. 680 nm) oder Helium-Neon-Laser (633 nm)
30 einsetzen zu können. Um eine wirksame Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffs zu gewährleisten, sollte sein Absorptionsmaximum möglichst in der Nähe der Emissionswellenlänge der verwendeten

Lichtquelle liegen. Dies ist jedoch bei den bekannten Farbstoffen oftmals nicht gegeben. Ferner überschneiden sich in vielen Fällen die Absorptionsspektren der bekannten Farbstoffe mit der Absorption fluoreszierender Substanzen aus biologischen Systemen. Es ist daher
5 wünschenswert, Fluoreszenzfarbstoffe ohne die genannten Nachteile für einen zuverlässigen und genauen Nachweis eines Analyten in einem biologischen System bereitzustellen.

Zur Verwendung als Markierungsgruppe in Nachweisverfahren für Analyten
10 ist neben einer einfachen und zuverlässigen Nachweisbarkeit eine gute Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln, insbesondere in wässrigen Systemen, notwendig. Weiterhin sollten derartige Verbindungen einfach und kostengünstig herzustellen sein und eine gute Haltbarkeit, d.h. Lagerfähigkeit, aufweisen.

15 Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand somit darin, geeignete Fluoreszenzfarbstoffe zur Verwendung als Markierungsgruppe für Verfahren zum Nachweis von Analyten bereitzustellen, die insbesondere Absorptionsmaxima aufweisen, die den Einsatz von kostengünstigen
20 Lichtquellen erlauben, außerhalb des Absorptionsbereichs von in biologischen Proben enthaltenen Stoffen absorbieren, gute Löslichkeit zeigen oder/und sich durch eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute auszeichnen, um die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise zu vermeiden.

25 Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



als Markierungsgruppen in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten, wobei

Y Sauerstoff oder N-R₈ bedeutet,

- 5 R₁, R₂, R₃ und R₈ bei jedem Vorkommen unabhängig Wasserstoff, eine Phenyl-, eine Phenylalkylgruppe mit 1-3 C-Atomen in der Alkylkette, eine Polyether- oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen, vorzugsweise mit bis zu 6 C-Atomen, bedeuten, die gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, oder einer oder mehrere der Reste R₁, R₂, R₃ und R₈ mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden, R₄, R₅, R₆ und R₇ jeweils unabhängig Wasserstoff, Halogen, Phenyl, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo- oder Carboxygruppe oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 15 C-Atomen bedeuten, wobei die Kohlenwasserstoffgruppen Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Cycloalkyl-, Aryl- oder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls jeweils einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy-, Aldehyd-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können, wobei einer oder mehrere der Reste R₄, R₆ und R₇ mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden können,

- Cyc einen organischen Rest bedeutet, der ein Ringsystem ausgewählt aus aromatischen, heteroaromatischen, chinoiden oder/und cycloaliphatischen Ringen umfaßt, das gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen,

Amino-, Hydroxy-, Sulfo-, Carboxy-, Aldehyd-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, und
X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen bedeutet.

5

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können als Markierungsgruppen in Verfahren zur qualitativen oder/und quantitativen Bestimmung eines Analyten verwendet werden. Die Bestimmung kann in wässrigen Flüssigkeiten, z.B. Proben von Körperflüssigkeiten wie etwa Blut, Serum,
10 Plasma oder Urin, Abwasserproben oder Lebensmitteln, durchgeführt werden. Das Verfahren kann sowohl als Naßtest, z.B. in einer Küvette, oder als Trockentest auf einem entsprechenden Reagenzträger durchgeführt werden. Die Bestimmung der Analyten kann dabei über eine einzige Reaktion oder durch eine Sequenz von Reaktionen erfolgen.

15

Überraschenderweise zeigte die Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I sehr gute Ergebnisse in chemischen und insbesondere in medizinischen und biologischen Nachweisverfahren zur Bestimmung eines Analyten.

20

Die Verbindungen der allgemeinen Formel I können in allen bekannten chemischen, medizinischen und biologischen Nachweisverfahren, in denen Fluoreszenzfarbstoffe als Markierungsgruppe geeignet sind, verwendet werden. Derartige Verfahren sind dem Fachmann bekannt und müssen
25 deshalb nicht weiter ausgeführt werden.

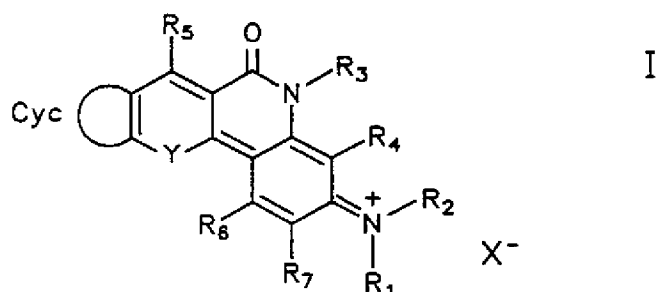
In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Verbindung der allgemeinen Formel I kovalent an einen für den nachzuweisenden Analyten spezifischen Rezeptor gekoppelt. Der spezifische Rezeptor ist jede
30 geeignete Verbindung oder jedes geeignete Molekül, vorzugsweise ist es ein Peptid, Polypeptid oder eine Nukleinsäure. Die Verbindungen I oder Konjugate dieser Verbindung können beispielsweise in Nukleinsäure-

Hybridisierungsverfahren oder immunchemischen Verfahren verwendet werden. Derartige Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor.

- 5 Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, neue Amidopyrylium-Verbindungen bereitzustellen, die insbesondere zur Verwendung als Markierungsgruppe in Nachweisverfahren von Analyten geeignet sind und die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise vermeiden.

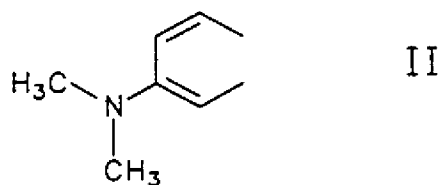
10

Diese Aufgabe wurde gelöst durch eine Verbindung der allgemeinen Formel I

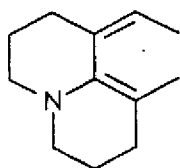


wobei

- 15 Y, R₁-R₇ und Cyc die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen besitzen, X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen bedeutet, mit der Maßgabe, daß wenn Y Sauerstoff, R₁, R₂ und R₃ Methyl und R₄, R₅, R₆ und R₇ Wasserstoff sind, Cyc keine Struktur der Formeln II oder III



20



III

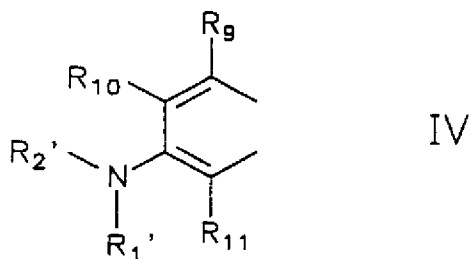
aufweist.

- Ein Vorteil der Verbindungen I ist, daß durch eine fast beliebige Substituentenvariation die Eigenschaften einzelner Verbindungen, z.B. die spektroskopischen Eigenschaften, die Lage der Absorptionsmaxima, die Löslichkeitseigenschaften, die Fluoreszenzabklingzeit und die Höhe der Quantenausbeute, stark variiert und somit wie gewünscht ausgewählt werden können. Auf diese Weise können Interferenzen mit Störsubstanzen in Proben, wie etwa Serum, Blut oder Plasma etc., vermindert oder sogar ganz vermieden werden. Die Herstellung der Verbindungen I kann nach an sich bekannten Methoden auf einfache und kostengünstige Weise erfolgen, wie in den nachfolgenden Beispielen erläutert wird. Ferner sind die Verbindungen unproblematisch handhabbar. Ein weiterer Vorteil der Verbindungen I ist die große Stokes-Verschiebung der Fluoreszenz, wodurch eine gute Abtrennung der Anregungsstrahlung ermöglicht wird. Weiterhin zeichnen sich die Verbindungen durch eine hohe Stabilität aus, was sich insbesondere positiv auf ihre Lagerfähigkeit auswirkt.
- Bevorzugt bedeutet Y Sauerstoff oder/und R₅ umfaßt ein aromatisches, gegebenenfalls substituiertes Ringsystem.

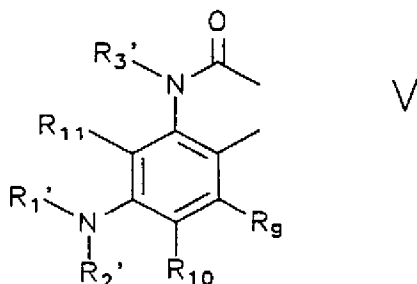
- Die Verbindungen weisen vorzugsweise eine zur kovalenten Kopplung fähige Gruppe auf, z.B. -COOH, -NH₂, -OH oder/und -SH. Über diese Kopplungsgruppe kann die Verbindung nach bekannten Methoden an einen Träger oder/und an ein Biomolekül gekoppelt werden. Als Träger kann jedes geeignete Material ausgewählt werden, z.B. poröses Glas, Kunststoffe, Ionenaustauscherharze, Dextrane, Cellulose, Cellulosederivate oder/und

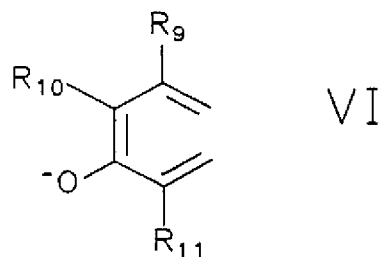
hydrophile Polymere. Die Biomoleküle werden vorzugsweise ausgewählt aus Peptiden, Polypeptiden, Nukleotiden, Nukleosiden, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloge oder/und Haptenen.

- 5 Überraschenderweise werden das Absorptionsmaximum und die Fluoreszenzquantenausbeute durch eine Kopplung der erfindungsgemäßen Verbindungen an die oben genannten Träger und Biomoleküle nicht wesentlich verändert.
- 10 In einer bevorzugten Verbindungsklasse sind R_1 mit R_7 oder/und R_2 mit R_4 verbrückt und bilden eine Ringsystem, insbesondere mit 5- oder 6-gliedrigen Ringen. In einer besonders bevorzugten Verbindungsklasse weist Cyc in Formel I eine Struktur der Formeln IV, V oder VI



15



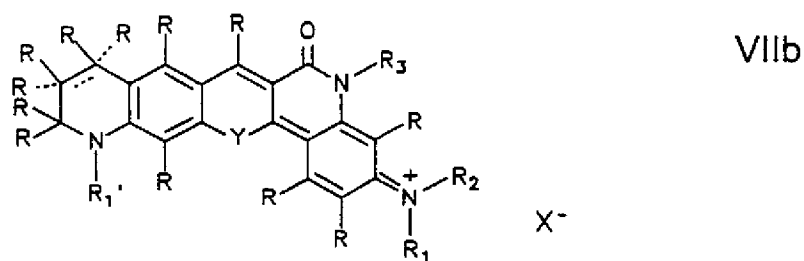
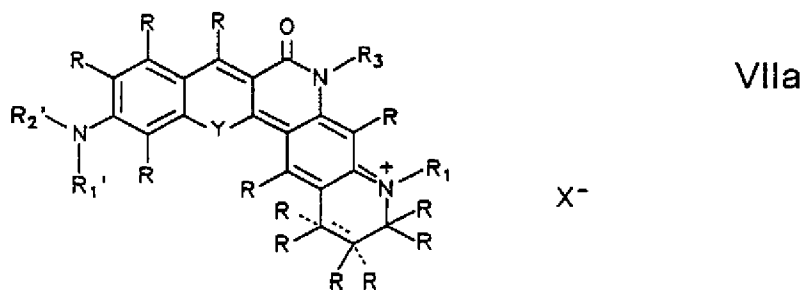


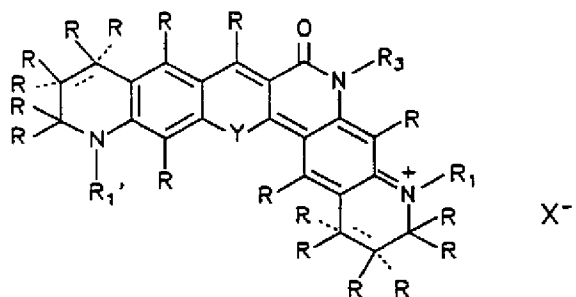
auf, wobei R_1' , R_2' und R_3' wie R_1 , R_2 und R_3 oben definiert sind und R_9 - R_{11} wie R_4 - R_7 oben definiert sind.

5

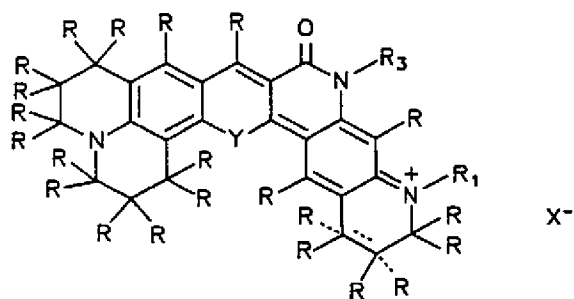
In einer weiteren bevorzugten Verbindungsklasse sind R_1' mit R_{11} oder/und R_2' mit R_{10} verbrückt und bilden ein Ringsystem, insbesondere einen 5- oder 6-gliedrigen Ring.

- 10 Beispiele für besonders bevorzugte Verbindungsklassen sind in den allgemeinen Formeln VIIa bis f dargestellt:

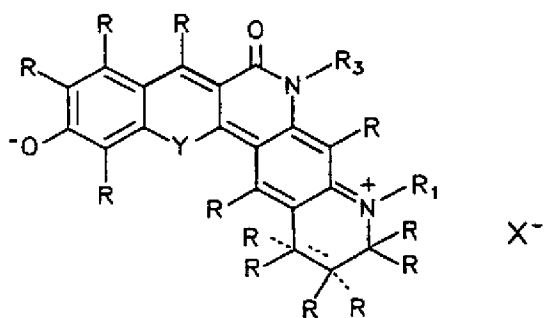




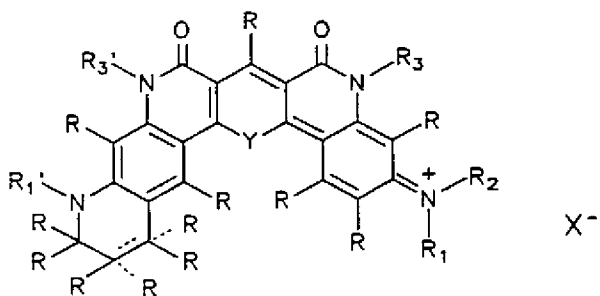
VIIc



VIIId



VIIe



VIIf

die gestrichelten Linien gegebenenfalls Doppelbindungen bedeuten, bei deren Vorhandensein die über eine gestrichelte Linie gebundenen Reste R fehlen,

5 X, Y, R₁, R₂, R₃, R₁', R₂' und R₃' wie oben definiert sind und R jeweils unabhängig wie R₄ oben definiert ist.

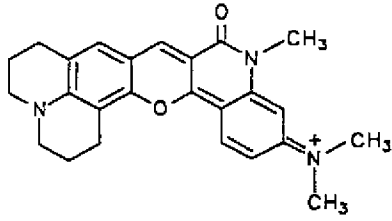
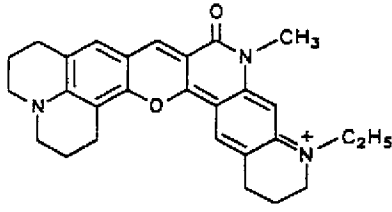
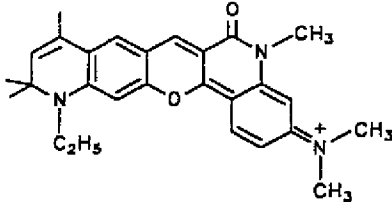
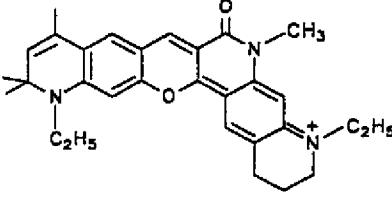
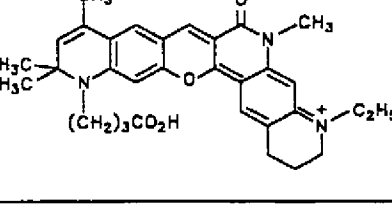
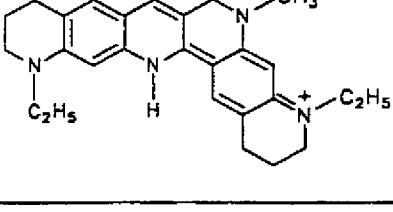
Konkrete Beispiele für erfindungsgemäße Verbindungen sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt.

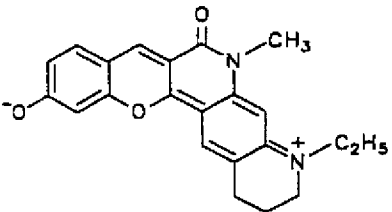
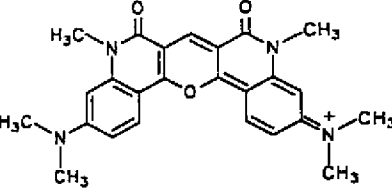
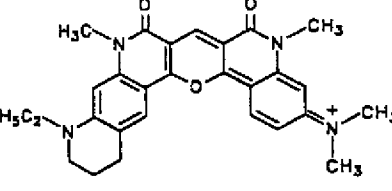
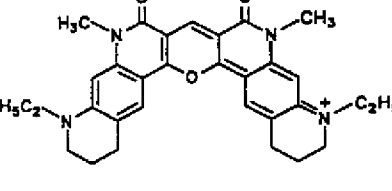
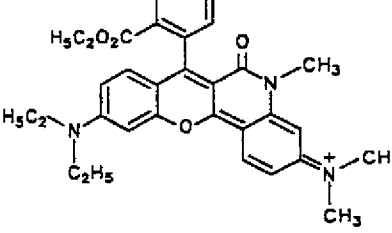
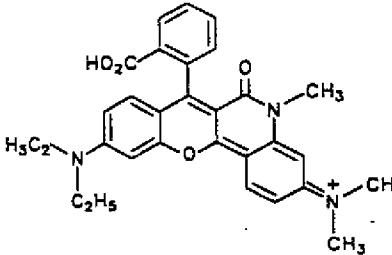
Tabelle 1 Erfindungsgemäße Amidopyrylium-Verbindungen

Spektrale Daten in Ethanol:

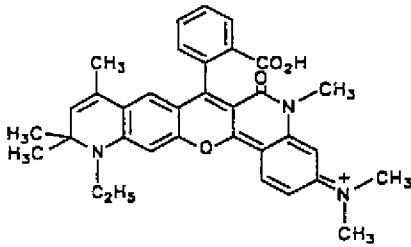
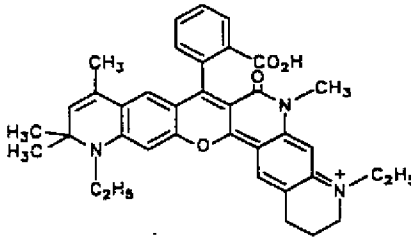
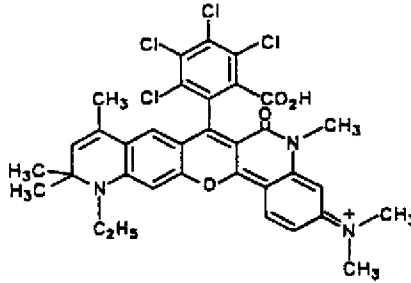
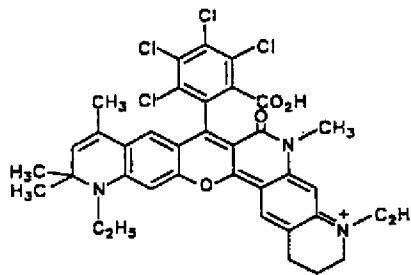
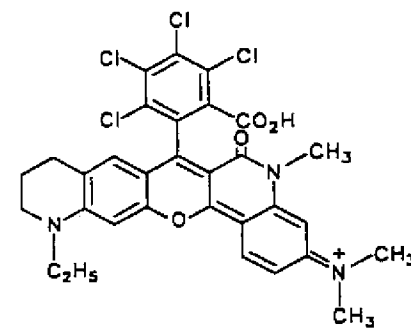
 λ_A : Absorptionsmaximum λ_F : Fluoreszenzmaximum5 Q_F : Fluoreszenzquantenausbeute

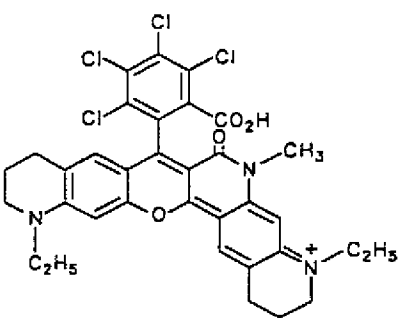
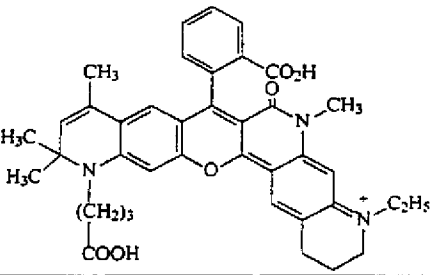
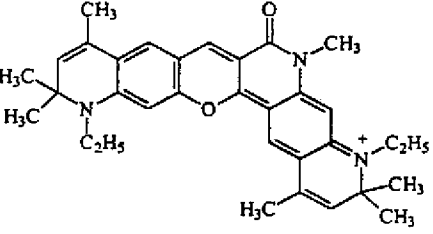
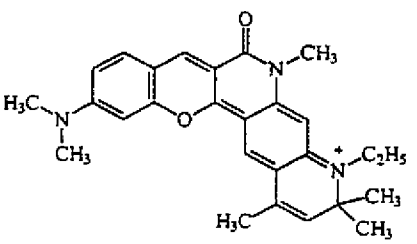
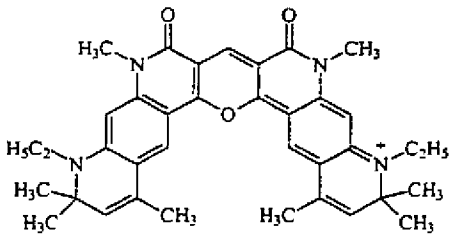
| | Struktur | λ_A / nm | λ_F / nm | Q_F / % |
|-------------|----------|------------------|------------------|-----------|
| 1 NK 9 | | 595 | 650 | 21 |
| 2 NK 1 | | 609 | 668 | 11 |
| 3 NK 8 | | 595 | 650 | 34 |
| 4 NK 5 | | 609 | 663 | 19 |
| 5 JA 227 | | 596 | 651 | 31 |

| | | | | |
|-----------------------|---|-----|-----|----|
| 6 Farbstoff 141 |  | 602 | 646 | 47 |
| 7 JA 230 |  | 613 | 665 | 31 |
| 8 JA 226 |  | 613 | 664 | 37 |
| 9 JA 228 |  | 628 | 675 | 24 |
| 10 NK 6 |  | 628 | 680 | 21 |
| 11 NK 4 |  | 522 | 605 | 21 |

| | | | | |
|------------------------|---|-----|-----|----|
| 12 NK 7 |  | 587 | 650 | 15 |
| 13 Farbstoff 140 |  | 664 | 715 | 2 |
| 14 NK 2 |  | 666 | 720 | 1 |
| 15 JA 210 |  | 682 | 725 | 4 |
| 16 NK 13 |  | 593 | 650 | 23 |
| 17 NK 13 A |  | 588 | 645 | 26 |

| | | | | |
|-------------|--|-----|-----|----|
| 18 NK 14 | | 603 | 665 | 14 |
| 19 NK 15 | | 597 | 642 | 51 |
| 20 NK 16 | | 608 | 660 | 30 |
| 21 NK 19 | | 573 | 635 | 17 |
| 22 NK 20 | | 589 | 665 | 9 |

| | | | | |
|-------------|---|-----|-----|----|
| 23 NK 21 |  | 608 | 655 | 44 |
| 24 NK 22 |  | 622 | 675 | 25 |
| 25 NK 10 |  | 640 | 695 | 15 |
| 26 NK 26 |  | 661 | 716 | 10 |
| 27 NK 17 |  | 617 | 672 | 20 |

| | | | | |
|-------------|---|-----|-----|----|
| 28 NK 18 |  | 631 | 686 | 15 |
| 29 NK 27 |  | 623 | 678 | 25 |
| 30 NK 28 |  | 635 | 690 | 30 |
| 31 NK 29 |  | 622 | 677 | 21 |
| 32 NK 30 |  | 718 | 770 | 2 |

| | | | | |
|-------------|--|-----|-----|----|
| 33 NK 31 | | 622 | 675 | 35 |
| 34 NK 33 | | 611 | 666 | 25 |
| 35 NK 35 | | 631 | 686 | 13 |
| 36 NK 36 | | 635 | 690 | 15 |
| 37 NK 37 | | 677 | 733 | 14 |

| | | | | |
|-------------|--|--------|-----|----|
| 38 NK 38 | | 673 | 725 | 11 |
| 39 NK 24 | | 629 | 684 | 30 |
| 40 NK 25 | | 643 | 698 | 35 |
| 41 NK 39 | | 610 | 664 | 18 |
| 42 NK 40 | | 610 | 663 | 20 |
| 43 NK 41 | | 609, s | 663 | 18 |

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert. Die Abbildungen 1, 2 und 3 zeigen die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der erfindungsgemäßen Verbindungen JA 227 (5), NK 13 (16) bzw. NK 14 (18).

Beispiele

Herstellung der Amidopyrylium-Verbindungen

5 A. Farbstoffe mit $R_5 = H$

Die Synthese der Vorprodukte erfolgt analog zur Synthesevorschrift von Harnisch und Brack (Liebigs Ann. Chem. 740 (1970), 164 - 168). Die Farbstoffsynthesen werden bei einer auf 100 °C verringerten
10 Reaktionstemperatur durchgeführt. Sie werden exemplarisch anhand der Strukturen 5 (JA 227) und 15 (JA 210) beschrieben. Die Darstellung der Edukte ist im nachfolgenden Beispiel enthalten oder literaturbekannt.

15 Verbindung JA 210

1. Stufe:

9-Ethyl-4-hydroxy-6,7,8,9-tetrahydro-1H-pyrido[2,3-g]chinol-2-on

20 3,5 g 7-Amino-1-ethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin und 3,7 g Malonsäurediethylester werden auf 180 - 190°C erhitzt. Über eine Kolonne (Länge: 10 cm; Durchmesser: 0,5 cm) wird solange Ethanol abdestilliert, bis sich im Kolben ein Feststoff gebildet hat. Der Feststoff wird in 30 ml Aceton verrührt, abgesaugt und der Niederschlag mit Methanol gewaschen. Der Niederschlag wird über
25 Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 20 g

¹H-NMR-Daten in CDCl₃:

δ 1,1 (T, 3H, -CH₃); 1,8 (M, 2H, -CH₂-); 2,7 (T, 2H, Ar-CH₂-); 3,2 - 3,4 (M, 4H, 2 x N-CH₂-); 5,4 (S, 1H, =CH-); 6,4 (S, 1H, ArH); 7,3 (S, 1H, ArH); 10,5 (S, 1H, -
30 NH); 10,6 (S, 1H, -OH)

2. Stufe:

9-Ethyl-4-methoxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on

2 g (8,2 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-6,7,8,9-tetrahydro-1H-pyrido[2,3-g]chinol-2-on
5 werden in 25 ml Dimethylformamid suspendiert und mit 6,7 g (0,12 mol)
Kaliumhydroxid versetzt. Dazu tropft man bei max. 60 °C 8,6 g (0,07 mol)
Dimethylsulfat (Kühlung mit Eis/Kochsalzbad). Die Suspension wird in 200 ml
Wasser ausgetragen. Es bildet sich ein gut filtrierbarer Niederschlag, der
abgesaugt und getrocknet wird.

10 Ausbeute: 1.8 g

Smp.: 208 °C unter Zersetzung

¹H-NMR-Daten in CDCl₃:

δ 1,2 (T, 3H, -CH₃); 1,9 (M, 2H, -CH₂-); 2,8 (T, 2H, Ar-CH₂-); 3,2 - 3,4 (M, 4H, 2
x N-CH₂-); 3,6 (S, 3H, -CH₃); 3,8 (S, 3H, -OCH₃); 5,8 (S, 1H, =CH-); 6,3 (S, 1H,
15 ArH); 7,4 (S, 1H, ArH)

3. Stufe:

9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on

20 0,5 g (1,8 mmol) 9-Ethyl-4-methoxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-
g]chinol-2-on werden in 5 ml 10 %-iger Salzsäure 2 h zum Rückfluß erhitzt. Die
Suspension wird mit 10 %-iger Natriumacetatlösung auf pH 5 abgestumpft. Der
Niederschlag wird abgesaugt und im Exsikkator getrocknet.

¹H-NMR-Daten in d₆-DMSO:

25 δ 1,1 (T, 3H, -CH₃); 1,9 (M, 2H, -CH₂-); 2,7 (T, 2H, Ar-CH₂-); 3,3 - 3,5 (M, 7H,
N-CH₃, 2 x N-CH₂-); 5,5 (S, 1H, =CH-); 6,3 (S, 1H, ArH); 7,4 (S, 1H, ArH); 10,8
(S, 1H, -OH)

4. Stufe:

30 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on-3-
carbaldehyd

Zu 3 ml Dimethylformamid tropft man bei 50 - 55 °C 0.4 g Phosphoroxychlorid. Die Lösung wird noch 1 h bei 50 °C verrührt. Anschließend fügt man bei derselben Temperatur unter Rühren 0,5 g (1,8 mmol) 9-Ethyl-4-methoxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on gelöst in 6 ml Dimethylformamid hinzu. Man rührt noch 5 h bei 80 - 90 °C. Die intensiv gelb gefärbte Lösung wird auf 50 ml Wasser und 10 g Eis ausgetragen und 12 h bei Raumtemperatur verrührt. Der hellgelbe Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet.

Absorptions- und Fluoreszenzmaximum in Ethanol: $\lambda_A = 439$ nm; $\lambda_F = 494$ nm

¹H-NMR-Daten in CDCl₃:

δ 1,3 (T, 3H, -CH₃); 2,0 (M, 2H, -CH₂-); 2,8 (T, 2H, Ar-CH₂-); 3,5 (M, 4H, 2 x N-CH₂-); 3,6 (S, 3H, N-CH₃); 6,1 (S, 1H, ArH); 7,7 (S, 1H, ArH); 10,4 (S, 1H, -CH=O)

5. Stufe:

JA 210

0,18 g (0,69 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on und 0,2 g (0,69 mmol) 4-Chlor-9-ethyl-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on-3-carbaldehyd werden in 20 ml Eisessig gelöst und 20 min in einem 100 °C warmen Ölbad erhitzt. Die Lösung wird in 100 ml Wasser gegossen und der Niederschlag abfiltriert. Der Farbstoff wird chromatographisch gereinigt.

¹H-NMR-Daten in DMSO-d₆:

δ 1,3 (T, 6H, -CH₃); 1,9 (S, 4H, -CH₂-); 2,7 (S, 4H, Ar-CH₂-); 3,4 (S, 6H, N-CH₃); 3,6 (M, 8H, 2 x N-CH₂-); 6,2 (S, 2H, ArH); 7,6 (S, 2H, ArH); 8,5 (S, 1H, -CH=)

Verbindung JA 227

30

1,2 g (4,5 mmol) 4-(7-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydrochinol-1-yl)-buttersäureethylester und 1,2 g (4,5 mmol) 4-Chlor-7-dimethylamino-1-methyl-

chinol-2-on-3-carbaldehyd werden in 50 ml Eisessig gelöst und 5 min in einem 100 °C warmen Ölbad erhitzt. Die Lösung wird in 500 ml 15 %-iger Natriumchloridlösung getropft und der Niederschlag abfiltriert. Der Farbstoff wird chromatographisch gereinigt.

5

B. Farbstoffe mit R₅ = (substituierter) Phenyl-Ring

Eine bevorzugte Darstellung der Verbindungen wird exemplarisch anhand der
10 Strukturen 18 (NK 14), 20 (NK 16) und 23 (NK 21) vorgestellt. Die Eduktsynthesen werden, soweit diese nicht literaturbekannt sind, analog zu den in Teil A beschriebenen Beispielen durchgeführt. Die Synthese der Benzoyl-benzoesäure-Derivate erfolgt analog zur literaturbekannten Darstellung des 6-(2-Carboxy-3,4,5,6-tetrachlorbenzoyl)-1-ethyl-7-hydroxy-
15 2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolins.

Verbindung NK 14

20 1,2 g (3,9 mmol) 2-(4-Dimethylamino-2-hydroxy)-benzoyl-benzoesäure und 1,0 g (3,9 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-g]chinol-2-on werden in 40 ml 1,1,2,2-Tetrachlorethan bis zur vollständigen Auflösung der Substanzen zum Rückfluß erhitzt. Nun werden insgesamt 5 g Phosphorpentoxid portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung
25 weitere drei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird die Mischung mit je 50 ml Wasser und Chloroform aus dem Kolben gelöst und nach dem Abtrennen der organischen Phase wird die Wasserphase noch dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zur Trockene einrotiert und der Farbstoff anschließend
30 säulenchromatographisch gereinigt.

Die Farbstofffraktionen werden einrotiert, der Rückstand in 50 ml Ethanol aufgelöst und nach der Zugabe von 10 ml Perchlorsäure (60 %-ig) durch

Zutropfen von Wasser ausgefällt. Nach dem Absaugen wird das Farbstoffperchlorat sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 700 mg

5

Verbindung NK 16

0,75 g (2,22 mmol) 9-(2-Carboxybenzoyl)-8-hydroxy-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-benzo[*ij*]chinolizin und 0,57 g (2,22 mmol) 9-Ethyl-4-hydroxy-1-methyl-10 6,7,8,9-tetrahydro-pyrido[2,3-*g*]chinol-2-on werden in 40 ml 1,1,2,2-Tetrachlorethan bis zur vollständigen Auflösung der Substanzen zum Rückfluß erhitzt. Nun werden insgesamt 5 g Phosphorpentoxid portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung weitere drei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird die Mischung mit je 50 ml Wasser und 15 Chloroform aus dem Kolben gelöst und nach dem Abtrennen der organischen Phase wird die Wasserphase noch dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zur Trockene einrotiert und der Farbstoff anschließend säulenchromatographisch gereinigt.

20 Die Farbstofffraktionen werden einrotiert, der Rückstand in 50 ml Ethanol aufgelöst und nach der Zugabe von 10 ml Perchlorsäure (60 %-ig) durch Zutropfen von Wasser ausgefällt. Nach dem Absaugen wird das Farbstoffperchlorat sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

25 Ausbeute: 160 mg

Verbindung NK 21

30 1,13 g (3,1 mmol) 6-(2-Carboxybenzoyl)-1-ethyl-7-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydro-chinolin und 0,68 g (3,1 mmol) 7-Dimethylamino-4-hydroxy-1-methyl-chinol-2-on werden in 60 ml 1,1,2,2-Tetrachlorethan bis zur

vollständigen Auflösung der Substanzen zum Rückfluß erhitzt. Nun werden insgesamt 4 g Phosphorpentoxid portionsweise zugegeben und die Reaktionsmischung weitere drei Stunden am Rückfluß gekocht. Nach dem Erkalten wird die Mischung mit je 50 ml Wasser und Chloroform aus dem Kolben gelöst und nach dem Abtrennen der organischen Phase wird die Wasserphase noch dreimal mit je 50 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zur Trockene einrotiert und der Farbstoff anschließend säulenchromatographisch gereinigt.

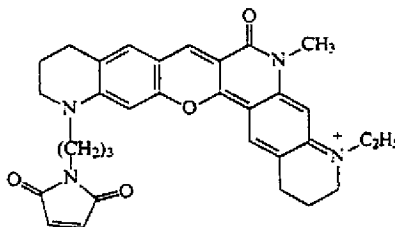
Die Farbstofffraktion wird einrotiert, der Rückstand in 25 ml Ethanol aufgelöst und nach der Zugabe von 8 ml Perchlorsäure (60 %-ig) durch Zutropfen von Wasser ausgefällt. Nach dem Absaugen wird das Farbstoffperchlorat sorgfältig mit Wasser gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet.

Ausbeute: 50 mg

C. Beispiele zur Konjugatbildung

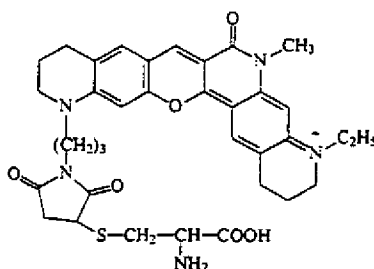
NK 41-Maleinimid

100 mg NK 41 (0.2 mmol) werden in 10 ml getrocknetem DMSO gelöst und mit 100 mg (1 mmol) Maleinsäureanhydrid versetzt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur ca. 24 h verrührt. Man tropft 50 ml einer 10 %igen wäßrigen Natriumperchloratlösung hinzu und filtriert den ausgefallenen Feststoff ab. Der Feststoff wird mit 25 mg Natriumacetat in 5 ml Essigsäureanhydrid suspendiert und für 30 min auf etwa 80 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen tropft man 30 ml der 10 %igen Natriumperchloratlösung hinzu, filtriert und trocknet den Feststoff.

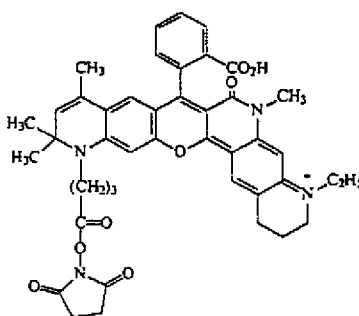


NK 41-Maleinimid-Cystein-Konjugat

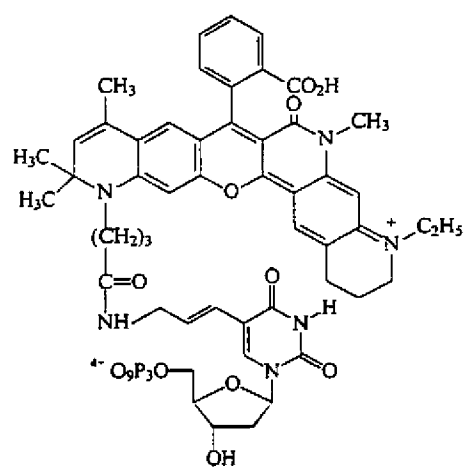
70 mg (0.16 mmol) NK 41-Maleinimid wird in 20 ml Ethanol gelöst und portionsweise mit 22 mg (0.16 mmol) Cystein versetzt. Man verrührt bei Raumtemperatur und tropft nach 30 min etwa 50 ml einer 10 %igen Natriumperchloratlösung hinzu. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und getrocknet.

**NK 27-Aktivester**

50 mg (0.1 mmol) NK 27 werden mit 0.2 mmol N-Hydroxysuccinimid und 0.2 mmol Dicyclohexylcarbodiimid in 20 ml Acetonitril gelöst. Man läßt 5 h bei Raumtemperatur rühren und rotiert das Produktgemisch ein. Die Reinigung erfolgt chromatographisch.

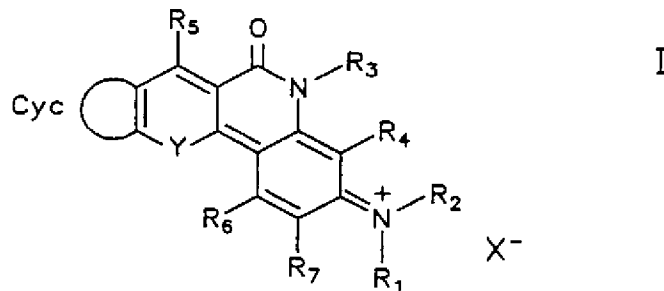
**NK 27-dUTP-Konjugat**

10 mol 5-(3-Aminoallyl)-dUTP werden in 0.5 ml 0.1 M Natriumborat-Puffer (pH 8) gelöst und mit einer Lösung aus 5 mol NK 27-Aktivester in 1 ml aminfreiem Dimethylformamid versetzt. Die Lösung wird 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand chromatographisch gereinigt.



Ansprüche

1. Verwendung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



5 als Markierungsgruppen in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten, wobei

Y Sauerstoff oder N-R₈ bedeutet,

R₁, R₂, R₃ und R₈ bei jedem Vorkommen unabhängig Wasserstoff, eine Phenyl, eine Phenylalkylgruppe mit 1-3 C-Atomen in der Alkylkette, eine
 10 Polyether- oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen, vorzugsweise mit bis zu 6 C-Atomen, bedeuten, die gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, oder einer oder
 15 mehrere der Reste R₁, R₂, R₃ und R₈ mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden,

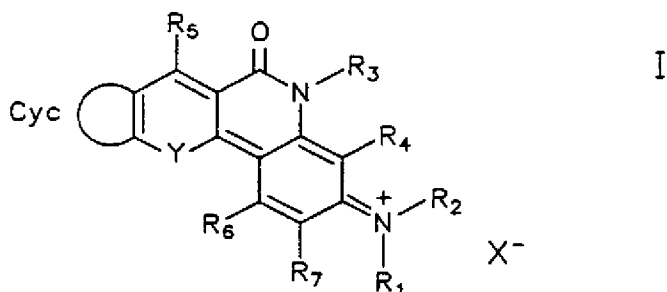
R₄, R₅, R₆ und R₇ jeweils unabhängig Wasserstoff, Halogen, Phenyl, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo- oder Carboxygruppe oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 15 C-Atomen bedeuten, wobei die
 20 Kohlenwasserstoffgruppen Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Cycloalkyl-, Aryl- oder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls jeweils einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy-, Aldehyd-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können,

25 wobei einer oder mehrere der Reste R₄, R₆ und R₇ mit einem benachbarten Substituenten ein Ringsystem bilden können,

Cyc einen organischen Rest bedeutet, der ein Ringsystem, ausgewählt aus aromatischen, heteroaromatischen, chinoiden oder/und cycloaliphatischen Ringen umfaßt, das gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Amino-, Hydroxy-, Sulfo-, Carboxy-, Aldehyd-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten kann, und

X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen bedeutet.

2. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Verbindung I kovalent an einen für den nachzuweisenden Analyten spezifischen Rezeptor gekoppelt wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Nachweisverfahren aus Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren und immunchemischen Verfahren ausgewählt wird.
4. Verbindungen der allgemeinen Formel I

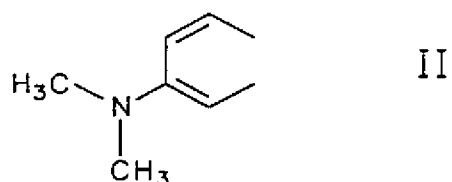


wobei

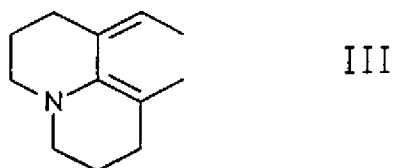
Y, R₁-R₇ und Cyc die in Anspruch 1 angegebenen Bedeutungen besitzen,

X gegebenenfalls zum Ladungsausgleich vorhandene Anionen

bedeutet,
 mit der Maßgabe, daß wenn Y Sauerstoff, R₁, R₂ und R₃ Methyl und R₄,
 R₅, R₆ und R₇ Wasserstoff sind,
 Cyc keine Struktur der Formeln II oder III



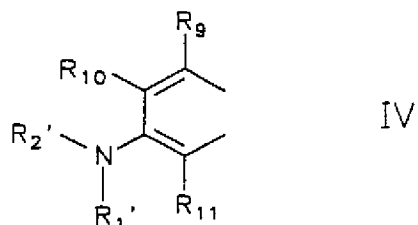
5

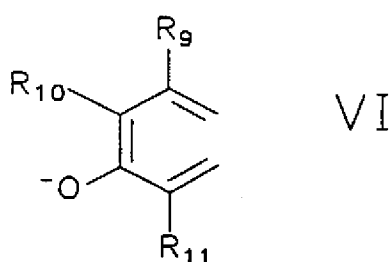
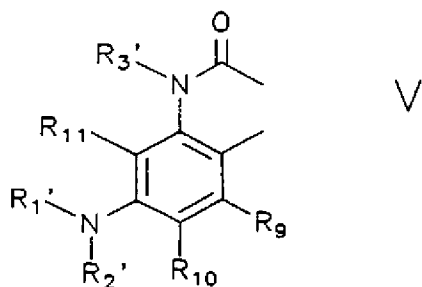


aufweist.

5. Verbindungen nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
 daß R₁ mit R₇ oder/und R₂ mit R₄ verbrückt sind und ein Ringsystem,
 insbesondere einen 5- oder 6-gliedrigen Ring, bilden.
6. Verbindungen der Formel I nach Anspruch 4 oder 5, worin Cyc eine
 Struktur der Formeln IV, V oder VI

15





aufweist, wobei

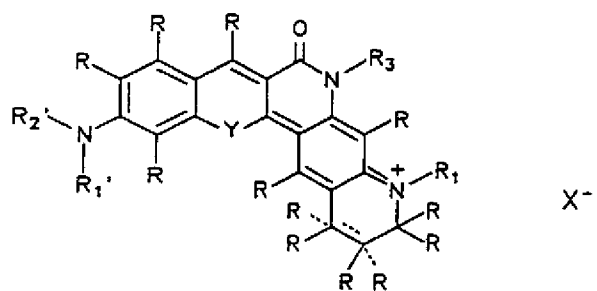
- 5 R_1' , R_2' und R_3' wie R_1 , R_2 und R_3 in Anspruch 1 definiert sind, und R_9 - R_{11} wie R_4 - R_7 in Anspruch 1 definiert sind.

7. Verbindungen nach Anspruch 6,

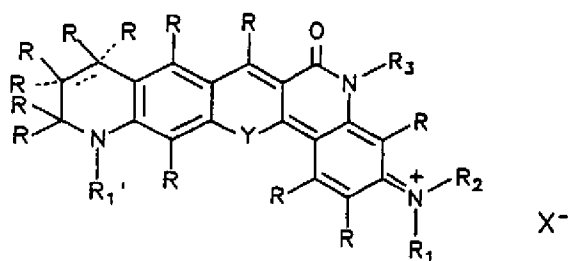
dadurch gekennzeichnet,

- 10 daß R_1' mit R_{11} oder/und R_2' mit R_{10} verbrückt sind und ein Ringsystem, insbesondere einen 5- oder 6-gliedrigen Ring bilden.

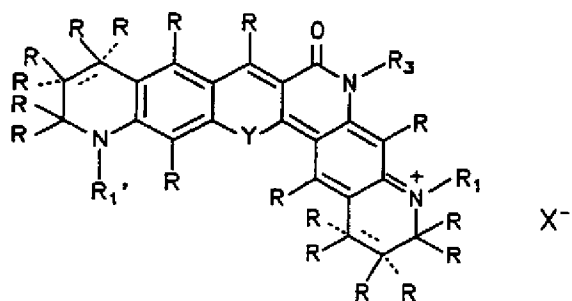
8. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 7, die einer der allgemeinen Formeln VIIa-f entsprechen



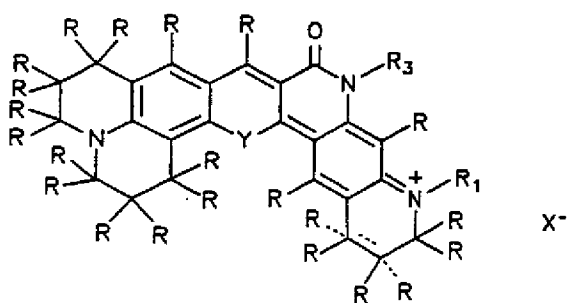
VIIa



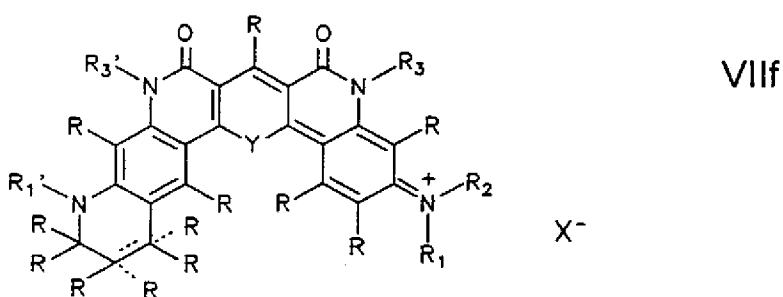
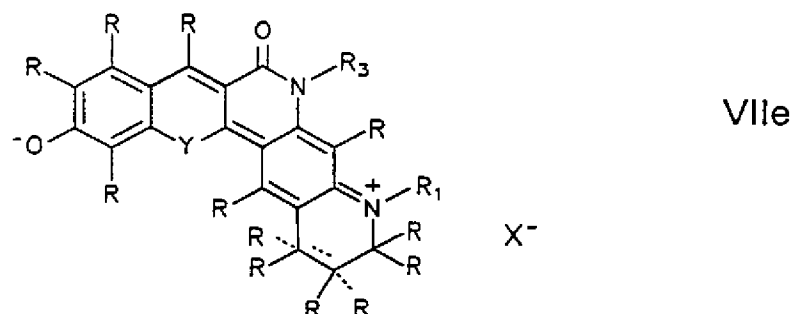
VIIb



VIIc



VIId



5 wobei

die gestrichelten Linien gegebenenfalls Doppelbindungen bedeuten und
bei Vorhandensein der Doppelbindungen die über eine gestrichelte Linie
gebundenen Reste R fehlen,

X, Y, R₁, R₂ und R₃ wie in Anspruch 4 und 5 definiert sind,

10 R₁', R₂' und R₃' wie in Anspruch 6 und 7 definiert sind, und

R jeweils unabhängig wie R₄ in Anspruch 4 definiert ist.

9. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 8,

dadurch gekennzeichnet,

15 daß Y Sauerstoff ist.

10. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 9,

dadurch gekennzeichnet,

daß R₅ ein aromatisches, gegebenenfalls substituiertes Ringsystem

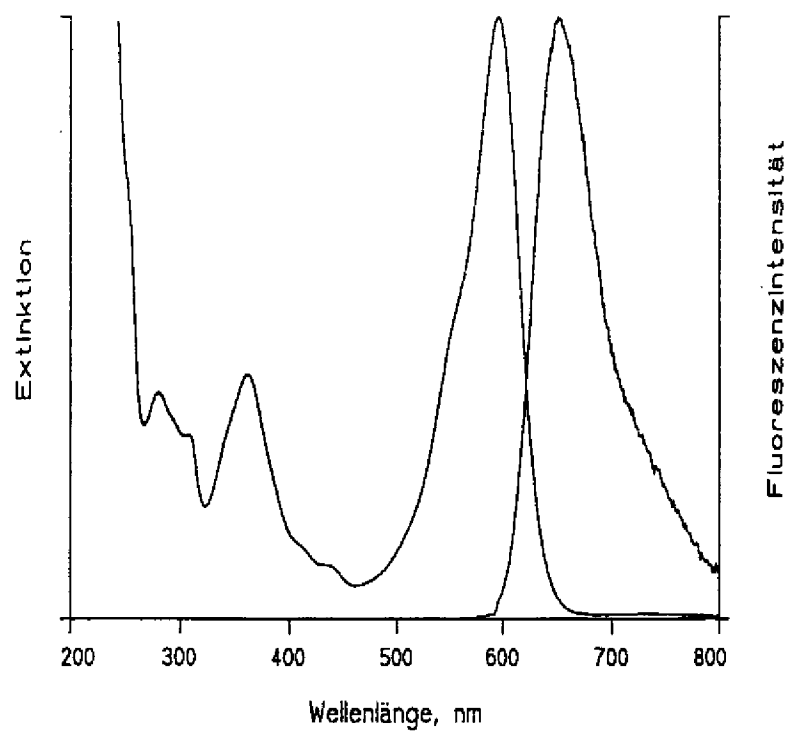
umfaßt.

11. Verbindungen nach einem der Ansprüche 4 bis 10,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß sie eine zur kovalenten Kopplung fähige Gruppe aufweisen.
12. Verbindungen nach Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Kopplungsgruppe -COOH, -NH₂, -OH oder/und -SH ist.
- 10 13. Verbindungen nach Anspruch 11 oder 12,,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie über Kopplungsgruppen an einen Träger oder/und an ein
Biomolekül gekoppelt sind.
- 15 14. Verbindungen nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Träger ausgewählt ist aus porösem Glas,
Ionenaustauscherharzen, Kunststoffen, Dextranen, Cellulose,
20 Cellulosederivaten oder/und hydrophilen Polymeren.
15. Verbindungen nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Biomolekül ausgewählt ist aus Peptiden, Polypeptiden,
25 Nukleotiden, Nukleosiden, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga
oder/und Haptenen.

Absorptions- und Fluoreszenzspektren in Ethanol

5

Abbildung 1: JA 227



10

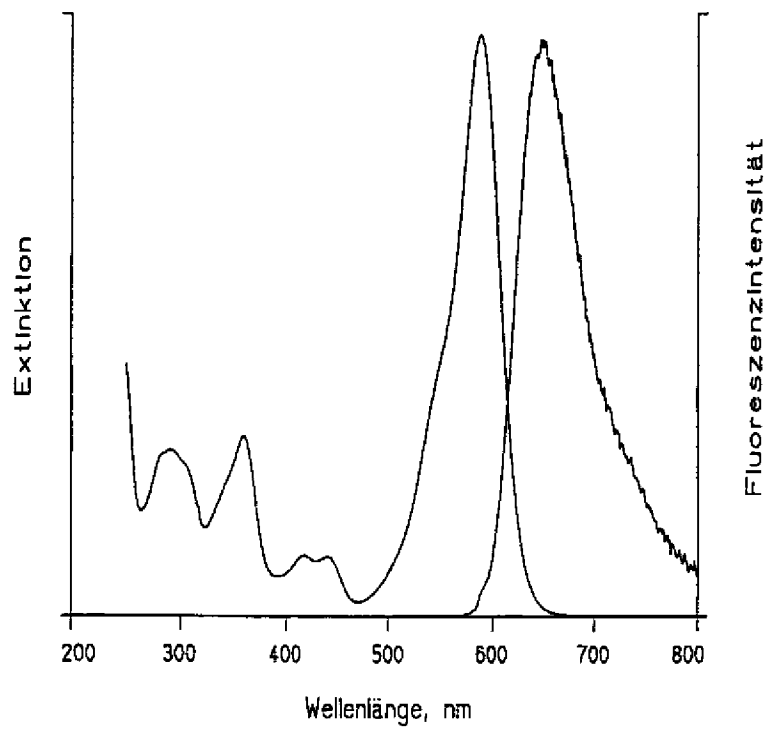
15

20

25

5 Abbildung 2: NK 13

10



15

5 Abbildung 3: NK 14

10

